

Die enzymatische Bestimmung der Mono-, Di- und Triglyceride des Serums nach dünn-schichtchromatographischer Trennung

Von N. ZÖLLNER, H. WOLFRAM und G. WOLFRAM

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

(Eingegangen am 11. April 1969)

Herrn Prof. Dr. J. Brugsch in freundschaftlicher Verehrung gewidmet

Die neutralen Glyceride wurden aus dem Serum extrahiert, dünn-schichtchromatographisch in Mono-, Di- und Triglyceride getrennt und das hydrolytisch freigesetzte Glycerin mit dem gekoppelten Enzymsystem Glycerokinase-Pyruvatkinase-Lactatdehydrogenase bestimmt. Mono-, Di- und Triglycerid-Glycerin liegt im Nüchternserum von gesunden Personen mit normalem Neutralfettspiegel im Verhältnis 3,1:5,7:91,2 vor. Bei Hyperlipämie besteht eine deutliche Vermehrung der Triglyceride, während die anderen Fraktionen relativ vermindert, absolut jedoch mäßig erhöht sind.

Die durch Heparin aktivierte Lipoproteinlipase führt bei einer alimentären Hyperlipämie in vivo zu einem massiven Abfall der Triglyceride, dem ein deutlicher Anstieg der Monoglyceride parallel geht, während der Diglyceridspiegel unverändert bleibt. Die Hemmung der Lipoproteinlipase durch Protamin bewirkt einen Wiederaufstieg der Triglyceride und einen Abfall der Monoglyceride.

The enzymic determination of mono-, di- and tri-glycerides of serum, following their separation by thin layer chromatography

Neutral glycerides were extracted from the plasma, separated by thin-layer-chromatography into mono-, di- and triglycerides, and hydrolyzed. The glycerol liberated was analyzed by the three step enzyme system, glycerokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase.

The ratio between mono-, di- and triglycerides in the serum of normal persons (fasted over night) with normal neutral fat levels is 3.1:5.7:91.2. In hyperlipaemia the triglycerides are increased significantly; the other two fractions, while showing a slight absolute increase are relatively decreased.

In alimentary hyperlipaemia, lipoproteinlipase activated by heparin causes a significant drop of triglycerides accompanied by an increase of monoglycerides, while the level of diglycerides remains unchanged. As a result of the inhibition of the lipoproteinlipase by protamine, the triglycerides increase again and the monoglycerides decrease.

Unter den großen Lipidfraktionen des Serums werden die Neutralfette von der Nahrungsaufnahme am deutlichsten beeinflusst, die postprandiale Hyperlipämie spiegelt die rege Beteiligung dieser Lipidfraktion am Fettstoffwechsel wider. Bei der Freisetzung der Fettsäuren aus Triglyceriden entstehen als Zwischenstufen Di- und Monoglyceride.

Als Ansatzpunkt für die chemische Bestimmung der Glyceridfraktionen bot sich das den Mono-, Di- und Triglyceriden gemeinsame Glycerin an.

Einen wesentlichen Gewinn an Spezifität für Glycerin bietet der enzymatische Test mit Glycerophosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.8) (1), der zur Neutralfettbestimmung im Serum benutzt werden kann (2, 3). ZÖLLNER und WARNOCK (4) bestimmten mit dieser Methode in Glycerinphosphatiden enthaltenes Glycerin, das sie aus Glycerophosphat, dem normalen Produkt der Alkalihydrolyse von Glycerinphosphatiden, mit saurer Phosphatase freisetzten. Die Verfahren haben indes einen Schritt zur Trennung der Neutralfette von den Phosphatiden zur Voraussetzung, da sonst bei der enzymatischen Bestimmung mit Glycerophosphatdehydrogenase (1) das aus Glycerinphosphatiden freigesetzte 1- α -Glycerophosphat in das Ergebnis mit eingeht.

Eine elegante enzymatische Methode zur Glycerinbestimmung bedient sich des gekoppelten Enzymsystems Glycerokinase-Pyruvatkinase-Lactatdehydro-

genase (5). Da aus Phosphatiden freigesetztes 1- α -Glycerophosphat nicht erfaßt wird, ist diese Bestimmung für Neutralfett-Glycerin spezifisch, ihre praktische Anwendung als Routinemethode für Neutralfett haben EGGSTEN und KREUTZ (6, 7) eindrucksvoll belegt. Diese Ergebnisse wurden von anderen Autoren bestätigt (8, 9).

CARLSON und WADSTRÖM (10) haben Mono-, Di- und Triglyceride säulenchromatographisch getrennt und anschließend Glycerin mittels Perjodat oxydation bestimmt. Später erwies sich die Dünnschichtchromatographie als ein zeitsparendes und zuverlässiges Trennverfahren, das PRIVET und BLANK (11) mit einer densitometrischen Auswertung der verkohlten Lipidfraktionen zu einem an Schnelligkeit bisher nicht zu unterbietenden Verfahren für die Analyse von Neutrallipiden kombinierten. Aus den Serumlipiden lassen sich allerdings auf der Kieselgel-G-Dünnschicht in einem Trennungsgang nicht die Triglyceride von den Cholesterinestern, die Diglyceride vom Cholesterin und die Monoglyceride von den Phosphatiden abtrennen, außerdem stellt bei dem extremen Mengenverhältnis von Mono- und Triglyceriden im Serum für die unspezifische Verkohlung der Glyceride die wechselnde Zahl der Doppelbindungen einen gewissen Unsicherheitsfaktor dar. Für Untersuchungen an den Neutralfetten des Serums ist es deshalb notwendig, der zeitsparenden und zuverlässigen Trennung auf der Dünnschicht eine

spezifische Bestimmung für Neutralfett-Glycerin zur Seite zu stellen. Wir haben eine Kombination der Dünnschichtchromatographie und der enzymatischen Glycerinbestimmung nach KREUTZ (5) entwickelt, die hier beschrieben werden soll.

Über erste Erfahrungen mit dieser Methode wurde bereits berichtet (12, 13).

Methodik

Prinzipien

Freies und gesamtes Glycerin werden aus frischem Serum nach EGGSTEIN und KREUTZ (7) bestimmt, die Differenz beider Werte ergibt das Neutralfett-Glycerin. Für die Bestimmung der Mono-, Di- und Triglyceride genügt es, das Neutralfett-Glycerin aus dem Lipidextrakt und den dünn-schichtchromatographisch getrennten Glyceridfraktionen zu bestimmen. Bei trüben, d. h. hyperlipämischen Seren empfiehlt sich die Bestimmung des gesamten Glycerins aus dem Serum oder des Neutralfett-Glycerins aus dem Lipidextrakt zur Orientierung über die in die Chromatographie einzusetzenden Extraktmengen. Gewebeproben werden homogenisiert, und eine dem Serum vergleichbare Menge Homogenat in die Lipidextraktion eingesetzt.

Reagenzien und Lösungen

Lipidextrakt nach CARLSON oder SPERRY

Chloroform p. a.

Methanol p. a.

Natriumchlorid-Lösung 0,9proz.

Calciumchlorid-Lösung 0,02proz.

Enzymatische Bestimmung des Glycerins

Das sogenannte „Reaktionsgemisch“ wird vor jeder Glycerinanalyse neu angesetzt. 10,0 ml setzen sich zusammen aus (Reagenzien von Boehringer-Mannheim):

0,4 ml DPNH · H ⁺	(14 mg/ml)
0,2 ml MgCl ₂	(0,5M)
0,4 ml ATP	(60 mg/ml)
0,4 ml PEP	(23 mg/ml)
0,04 ml LDH	(5 mg/ml)
0,1 ml PK	(2 mg/ml)
ad 10,0 ml Triäthanolamin-Puffer (0,1M, pH 7,6)	

Standardlösung

10 µg Glycerin/ml dest. Wasser. Wasserfreies Glycerin einwiegen, fertige Lösung in kleine Ampullen abfüllen und bei +4° aufbewahren.

Hydrolyse

1N äthanolische Kalilauge: 6,6 g 85proz. Kaliumhydroxyd p. a., glycerinfrei, in 10 ml dest. Wasser lösen, abkühlen, mit Äthanol p. a. auf 100 ml auffüllen. Kontrolle durch Titration.

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel G-Dünnschichtplatten (200 × 200 mm), Schichtdicke 0,25 mm; n-Hexan p. a.-Diäthyläther p. a. (40 + 60; v + v). 0,2proz. wäbr. Kaliumpermanganat-Lösung.

Elution

Chloroform p. a.-Methanol p. a. (9 + 1; v + v).

Bestimmung des Neutralfett-Glycerins aus dem Lipidextrakt

Lipidextraktion

a) nach CARLSON (14): 1 ml Serum wird in 5 ml Methanol gefällt, und nach Zugabe von 10 ml Chloroform und 15 ml 0,9proz. NaCl-Lösung jeweils mit einem Glasstab untermischt. Nach

Phasentrennung werden obere Phase und Zwischenphase (gefälltes Serumeiweiß) mit einer Pipette durchstoßen, und die untere Phase, weitgehend konstant 10 ml, wird möglichst vollständig gewonnen.

b) nach SPERRY (15): 1 ml Serum wird in Chloroform-Methanol (2 + 1) gefällt, das Volumen wird mit Chloroform-Methanol auf 25 ml aufgefüllt, und das denaturierte Serumeiweiß wird abfiltriert. 20 ml Filtrat werden mit 8 ml 0,02proz. CaCl₂-Lösung gewaschen. Nach Phasentrennung verwirft man die obere Phase.

Verseifung der neutralen Glyceride

Bei normalem Neutralfettgehalt des Serums wird 0,5 ml der unteren Phase im Duplikat oder Triplikat in Zentrifugenspitzen mit Schliffverschluß bei 80° zur Trockne gebracht. Lipide, die an der Innenwand der Gläser haften, spült man mit 0,1 ml Chloroform sorgfältig in die Spitze und bläst das Chloroform mit Stickstoff ab. Die zuverlässige Entfernung des Lösungsmittels ist Voraussetzung für niedrige Leerwerte. Abweichend von EGGSTEIN und KREUTZ (7) wird der Lipidrückstand in 0,05 ml Äthanol gelöst und mit N äthanolischer KOH zum Endvolumen 0,1 ml aufgefüllt. Falls bei hohem Lipidgehalt noch Fetttropfen sichtbar sind, schüttelt man die fest verschlossenen Gläser kurz im heißen Wasserbad. Diese Ansätze und ein Leerwert (Wasser statt Serum wird durch den Extraktionsgang geführt) werden bei 70° 30 Min. verseift. Eine Neutralisation des Hydrolysats ist nicht notwendig.

Bestimmung des freigesetzten Glycerins

Zu 0,1 ml des auf Raumtemperatur abgekühlten Hydrolysats werden 0,9 ml Triäthanolamin-Puffer und 1,0 ml Reaktionsgemisch gegeben und die Lösung, 10 Min. später, 5 Min. lang zentrifugiert (3000 g). In 1 ml klarem Überstand registriert man am Photometer die Extinktion, gibt dann 5 µl Glycerokinase-Lösung zu, mischt und notiert 5 Min. später erneut die Extinktion (Eppendorf-Photometer, Photozelle s, Filter 366 nm, Ablesung in Halbmikroküvetten, d = 10 mm, b = 4 mm, gegen dest. Wasser oder Luft).

Berechnung des Neutralfett-Glycerins

Der Glyceringehalt der eingesetzten Extraktprobe läßt sich über die Extinktion der Glycerinstandardlösung berechnen. Als Umrechnungsfaktor von Glycerin zu Neutralfett dient 9,31. Hierbei ist der Anteil der Mono- und Diglyceride, der in der Regel unter 10% liegt, nicht berücksichtigt.

Bestimmung des Mono-, Di- und Triglycerid-Glycerins

Dünnschichtchromatographie

Von der unteren Phase der Lipidextraktion werden 0,5 ml für das Referenzchromatogramm auf Bahn 1 und 6,0–9,0 ml für die Trennung der Glyceridfraktionen auf Bahn 2 der Platte I (Abb. 1) nach Einengen quantitativ auf die Dünnschicht aufgetragen. Die

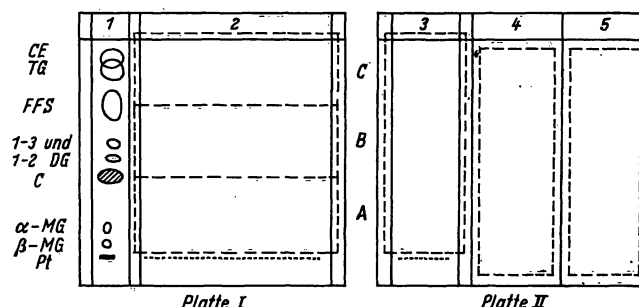


Abb. 1

Unterteilung der Dünnschicht-Platten

Pt = Phosphatide

β-MG = β-Monoglyceride

α-MG = α-Monoglyceride

C = Cholesterin

1-, 3- u. 1-, 2-DG = 1-, 3- u. 1-, 2-Diglyceride

FFS = Freie Fettsäuren

TG = Triglyceride

CE = Cholesterinester

Trennung mit dem Fließmittel n-Hexan-Diäthyläther (40 + 60; v + v) dauert bei Kammersättigung 25 Min. Auf Bahn 1 wird die Trennung durch Besprühen mit 0,2proz. wäbr. Kaliumpermanganatlösung festgestellt und die Abgrenzung der Glyceridfraktionen gemäß Schema der Platte I in Abbildung 1 durchgeführt.

Elution der neutralen Glyceride aus dem Kieselgel

Das Kieselgel mit den Glyceridfraktionen bringt man in Zentrifugengläser mit Schliffverschluß und eluiert die Glyceride mit zweimal 5 ml Chloroform-Methanol (9 + 1; v + v) je 10 Min. lang unter Schütteln (Magnetrührer!). Das Kieselgel wird jeweils bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abpipettiert. In Zentrifugenspitzgläsern mit Schliffverschluß werden vom Überstand zur Trockene gebracht: 2 × 4 ml der Fraktion mit den Monoglyceriden (A), 2 × 4 ml der Fraktion mit den Diglyceriden (B) und 3 × 1 ml der Fraktion mit den Triglyceriden (C). Als Elutionsmittelleerwert werden 4 ml des Elutionsgemisches eingesetzt.

Die Hydrolyse der Glyceride und die enzymatische Bestimmung des freigesetzten Glycerins erfolgt wie oben beschrieben. Der Glyceringehalt des Ansatzes wird über die Extinktion der Glycerin-Standardlösung berechnet. Als Umrechnungsfaktor zu Monoglyceriden gilt 3,44, zu Diglyceriden 6,74 und zu Triglyceriden 9,31. Diesen Faktoren liegt ein mittleres Molekulargewicht der Neutralfett-Fettsäuren von 273 zugrunde.

Versuche zur Methode

Lipidextraktion

Bei der Reinigung des Chloroform-Methanol-Extraktes mit Salzlösungen kommt es zu geringen Verlusten an polaren Lipiden, die in die obere Phase wandern (15, 16). Auf Grund der chemischen Struktur steht zu erwarten, daß von den neutralen Glyceriden die Monoglyceride am leichtesten in die wäbr. Phase wechseln. Erhebliche Verluste dieser kleinsten Serumglyceridfraktion fallen, auf das gesamte Neutralfett bezogen, kaum ins Gewicht. In einem Modellversuch wurde eine dem Neutralfett des Serums vergleichbare Menge Triolein, das geringe Mengen Di- und Monoolein enthält, in Chloroform-Methanol gelöst und mit 0,02proz. CaCl_2 -Lösung ausgeschüttelt. Der Glyceringehalt der oberen Phase lag unter 0,2% der eingesetzten Menge. Bei dem gleichen Versuch mit reinem Monoglycerid lagen die Verluste unter 10% der eingesetzten Menge. Vergleichende Bestimmungen des Glyceridgehaltes in Serum sowie Lipidextrakten nach SPERRY und CARLSON ergaben gut übereinstimmende Werte (Tab. 1).

Tab. 1
Neutralfett-Glycerin im Serum (7) und den Lipidextrakten nach SPERRY (15) und CARLSON (14)

Neutralfett-Glycerin (mg/100 ml)					
Serum (7)	SPERRY (15)	CARLSON (14)	%	%	%
A	B	C	A	B	C
20,2	20,8	20,8	100	103,0	103,0
22,6	23,5	23,9	100	103,7	105,7
625,5	601,6	607,9	100	96,2	97,2
26,3	27,3	25,2	100	103,8	95,8
7,8	7,9	8,2	100	101,0	105,1
7,3	7,7	8,0	100	105,5	109,5
—	28,2	29,7	—	100	105,3
—	200,1	201,1	—	100	100,5
—	8,0	8,1	—	100	101,2
10,3	—	10,1	100	—	98,0
11,2	—	11,4	100	—	101,8
188,0	—	184,7	100	—	98,2
12,4	12,6	—	100	101,6	—
19,0	18,8	—	100	98,9	—
31,0	31,9	—	100	102,9	—

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie bringt eine zuverlässige reproduzierbare Trennung in Mono-, Di- und Triglyceride. Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit authentischen Substanzen (Abb. 2). Nach dem Besprühen der Referenzbahn dienen die Phosphatide, das freie Cholesterin und die Cholesterinester zur Abgrenzung der Glyceridfraktionen. Die Phosphatide in der Monoglyceridfraktion, Cholesterin und freie Fettsäuren in

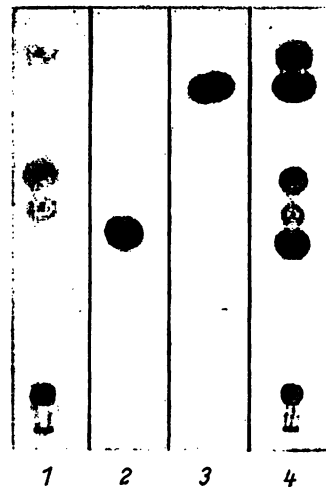


Abb. 2

Dünnschichtchromatographische Trennung von Testsubstanzen auf Kieselgel G mit dem Fließmittel n-Hexan-Diäthyläther (40 + 60, v + v) 1. Monoolein mit Di- und Triolein, 2. Cholesterin, 3. Cholesterinacetat, 4. Gemisch aus 1—3.

der Diglyceridfraktion sowie freie Fettsäuren und Cholesterinester in der Triglyceridfraktion stören die enzymatische Bestimmung des freigesetzten Glycerins nicht.

Elution der neutralen Glyceride aus dem Kieselgel

Die Summe der dünnschichtchromatographisch getrennten Neutralfettfraktionen stimmt mit den Werten für gesamtes Neutralfettglycerin im Lipidextrakt nach CARLSON (14) gut überein (Tab. 2). In Modellversuchen mit reinem Monoglycerid wurden

Tab. 2

Wiederfindungsrate des Neutralfett-Glycerins nach dünnschichtchromatographischer Trennung der neutralen Glyceride (Abb. 1, Platte I, Bahn 2), Elution und Bestimmung des Mono-, Di- und Triglycerid-Glycerins.

Gesamtes Neutralfett-Glycerin mg/100 ml			Wiederfindungsrate in %
im Lipid-Extrakt nach CARLSON (14)	als Summe der Fraktionen MG + DG + TG		
15,90	15,50		97
26,42	25,66		97
12,13	11,54		95
46,30	47,50		103
20,82	19,54		94
607,9	645,20		106
26,42	26,37		100
8,19	8,25		100
11,00	11,40		104
15,40	15,40		100
			\bar{x} 99,6

nach Elution mit zweimal 5 ml Chloroform-Methanol (9 + 1) im Eluat mehr als 90% der eingesetzten Menge Monoglycerid wiedergefunden.

Leerwert

Chloroform und Methanol erhöhen den Leerwert. Durch langsames Erhitzen auf 80° läßt sich das Elutionsgemisch vollständig abdampfen und die Leerextinktion unter 0,025 halten. In Kontrollanalysen lagen die Glycerinverluste bei diesen Temperaturen unter 1%. Es wurde darauf geachtet, daß ΔE der kleinsten Fraktion mindestens die doppelte Höhe des Leerwertes erreichte. Das

Tab. 3

Der Einfluß des Kieselgel (Bahn 4 in Abb. 1) auf den Lösungsmittelleerwert. Die Zahlen sind jeweils der Mittelwert aus 24 Analysen.

Chloroform-Methanol (9 + 1)	$\bar{x} \Delta E \cdot 10^3$ der Leerwerte (n = 24)	
	ohne Kieselgel	mit Kieselgel
1 ml	16,0	16,7
4 ml	22,2	22,5

Kieselgel hat keinen nennenswerten Einfluß auf den Leerwert (Tab. 3). Für vergleichende Analysen wurde das Kieselgel der Bahn 4 (Abb. 1) herangezogen.

Enzymatische Glycerinbestimmung im Lipidextrakt

EGGSTEIN und KREUTZ bestimmen das Neutralfett-Glycerin im Serum. Geht man von einem Lipidextrakt aus, muß das Serumwasser durch Äthanol ersetzt werden. Der Anstieg der Alkoholkonzentration im Meßansatz von 2,5% auf 5% bleibt aber ohne Folgen für die Aktivität der Enzyme. Da der Lipidrückstand in reinem Äthanol besser in Lösung geht als in 0,5N äthanolischer KOH wird er in reinem Äthanol aufgenommen und eine gleiche Menge 1N äthanolische KOH zugesetzt. Beim Mischen lipidreicher Hydrolysate mit Puffer und Reaktionsgemisch tritt in den Proben eine Trübung auf (8), die durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Damit dem klaren Überstand das Endvolumen von 1,0 ml entnommen werden kann, wurden Enzym- und Coenzymensatz verdoppelt.

Zuverlässigkeit

Die Spezifität der Methode ist gegeben durch die Bestimmung mit Glycerokinase, die außer mit Glycerin noch mit Dioxyaceton und L-Glyceraldehyd reagiert, Verbindungen die jedoch im Blut nicht vorkommen. Neben den neutralen Glyceriden werden unter den gewählten Hydrolysebedingungen auch Glycerinphosphatide gespalten. Das alkalistabile Spaltprodukt Glycerophosphat wird von der Bestimmungsmethode jedoch nicht erfaßt. Die Empfindlichkeit und Richtigkeit der enzymatischen Glycerinbestimmung wurde von EGGSTEIN und KREUTZ (7) durch Zumischversuche und statistisch ausgewertete Vergleichsbestimmungen hinreichend belegt, so daß von uns nur noch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nach dünnsschichtchromatographischer Trennung der neutralen Glyceride zu prüfen war. Die Wiederfindungsrate von Neutralfett-Glycerin nach dünnsschichtchromatographischer Trennung in die Glyceridfraktionen im Vergleich zur Bestimmung des gesamten Neutralfett-Glycerins in der Dünnschicht liegt im

Tab. 4
Vergleich der Neutralfett-Glycerin-Werte nach dünnsschichtchromatographischer Trennung; Bestimmung (a) unfractioniert von Platte II, Bahn 3 und (b) fraktioniert von Platte I, Bahn 2 (vgl. Abb. 1)

Gesamtes Neutralfett-Glycerin aus dem Extrakt nach CARLSON (14).		
a Δ Extinktion korrigiert für b	b $\Sigma \Delta$ Extinktion MG + DG + TG	b in % von a
1,850	1,931	104,3
1,760	1,827	103,8
1,813	1,860	102,5
1,837	1,872	101,9
0,688	0,720	104,6
2,780	2,825	101,6
1,025	1,030	100,4
0,690	0,725	105,0
0,798	0,815	102,1
3,520	3,647	103,6
		\bar{x} 102,98

Mittel bei 103% (Tab. 4). Die Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus fünf Lipidextrakten des gleichen Serums ergab für die Monoglyceridfraktion als Variationskoeffizienten 6,02%, für die Diglyceridfraktion 2,18% und für die Triglyceridfraktion 4,04% (Tab. 5).

Ergebnisse

Mit der Methode wurden die Seren von gesunden Erwachsenen und von Patienten untersucht (Tab. 6 u. 7). Das Verhältnis von Triglycerid-Glycerin zur Summe aus Monoglycerid- und Diglycerid-Glycerin ist im Nüchternserum gesunder Erwachsener weitgehend konstant 90:10. Die Anteile des Monoglycerid- und Diglycerid-Glycerins können stark schwanken. Das Diglycerid-Glycerin übersteigt in der Regel das Monoglycerid-Glycerin. Bei nur mäßig erhöhtem Neutralfett bleibt

Tab. 5
Mehrfachbestimmung von Mono-, Di- und Triglycerid in einem Lipidextrakt nach CARLSON (14)

	Mono-Glycerid- Glycerin mg/100 ml	Di-Glycerid- Glycerin mg/100 ml	Tri-Glycerid- Glycerin mg/100 ml	MG:DG:TG %
Platte I	0,31 0,35	0,90 0,92	25,7 25,0 24,6	1,25:3,56:95,19
Platte II	0,33 0,35	0,88 0,92	25,7 24,6 24,3	1,30:3,44:95,26
Platte III	0,33 0,35	0,96 0,92	25,1 22,5 23,7	1,35:3,74:94,91
Platte IV	0,29 0,33	0,93 0,90	25,9 23,3 23,6	1,16:3,46:95,38
Platte V	0,33 0,35	0,90 0,93	24,9 24,0 24,3	1,32:3,58:95,10
Durchschnitt \bar{x}	0,332	0,916	24,48	1,29:3,52:95,19
Standardabweichung σ	0,02	0,02	0,99	
Variationskoeffizient V	6,02%	2,18%	4,04%	

Tab. 6
Nüchternwerte gesunder Erwachsener

Neutralfett- Glycerin mg/100 ml	Freies Glycerin mg/100 ml	Monoglycerid- Glycerin mg/100 ml	Diglycerid- Glycerin mg/100 ml	Triglycerid- Glycerin mg/100 ml	MG-G in % des Neutralfett-Glycerins	DG-G	TG-G
8,2	0,9	0,38	0,57	7,31	4,6	6,9	88,5
8,4	0,4	0,19	0,61	7,62	2,3	7,3	90,4
9,6	0,5	0,19	0,68	8,80	2,0	7,0	91,0
10,6	0,2	0,29	0,47	10,43	2,5	4,2	93,3
12,9	0,5	0,12	0,39	12,44	0,9	3,0	96,1
15,5	0,6	0,20	1,65	13,66	1,3	10,6	88,1
11,4	1,4	0,68	0,63	10,12	6,0	5,6	88,4
5,8	0,7	0,36	0,43	5,02	5,9	7,1	87,0
11,5	0,4	0,38	0,28	10,88	3,3	2,4	94,3
7,1	0,6	0,20	0,18	6,70	2,8	2,5	94,7
					3,16	5,66	91,18

Tab. 7

Neutralfett-Glycerin, freies Glycerin und die Fraktionen der neutralen Glyceride (Werte in Klammern in % des Neutralfett-Glycerins) im Serum von Patienten mit primären Hyperlipidämien und Krankheiten, die mit einer Störung des Lipidstoffwechsels einhergehen können

Diagnose	Neutralfett-Glycerin mg/100 ml	Freies Glycerin mg/100 ml	Monoglycerid-Glycerin mg/100 ml	Diglycerid-Glycerin mg/100 ml	Triglycerid-Glycerin mg/100 ml
Kohlenhydrat-induzierte Hyperlipämie	59,2	3,1	0,3 (0,6)	3,1 (5,2)	55,8 (94,2)
Gemischte Hyperlipidämie	503,8	2,9	1,0 (0,2)	15,7 (3,4)	487,1 (96,4)
Gemischte Hyperlipidämie	282,7	1,3	0,3 (0,1)	3,1 (1,1)	279,3 (98,8)
Gemischte Hyperlipidämie	645,3	9,1	7,2 (1,1)	11,8 (1,8)	626,3 (97,1)
Gemischte Hyperlipidämie	31,6	3,1	0,1 (0,3)	0,7 (2,2)	30,8 (97,5)
Diabetes mellitus	19,4	1,1	1,2 (6,0)	1,4 (7,0)	16,8 (87,0)
Pankreatitis	68,8	3,1	0,2 (0,3)	1,5 (2,2)	67,1 (97,5)
Chronische Hepatitis	25,6	0,8	0,3 (1,3)	0,9 (3,6)	24,4 (95,1)
Lebercirrhose	15,0	2,0	0,4 (3,0)	0,2 (1,2)	14,4 (95,8)
Lebercirrhose	8,3	4,3	0,3 (3,8)	0,4 (4,2)	7,6 (92,0)
Obliterierende Angiopathie	19,5	0,4	0,4 (2,1)	0,6 (3,3)	18,5 (94,6)
Obliterierende Angiopathie	7,5	0,5	0,1 (1,5)	0,6 (8,4)	6,3 (90,1)

dieses Verhältnis der neutralen Glyceridfraktionen gewahrt, bei einer ausgeprägten Hyperlipämie liegt das Triglycerid-Glycerin über 95% und das Monoglycerid-Glycerin kaum über 1%.

Das Verhalten der Neutralfettfraktionen unter der Einwirkung des Klärfaktors haben bereits CARLSON und WADSTRÖM (10) untersucht und eine starke Zunahme der Monoglyceridfraktion beschrieben. Mit der vorliegenden Methode wurden diese Versuche wiederholt und die Wirkung von Protaminsulfat auf die Heparin-induzierte Lipämieklärung untersucht. Bei einer gesunden Versuchsperson wurde mit 150 g Fett in Form von Butter, Sahne und Käse eine alimentäre Hyperlipämie erzeugt und 6 Stunden postprandial mit 10000 IE Heparin i.v. ein Klärfaktor induziert (Abb. 3). Die sofort einsetzende Lipämieklärung ist durch den massiven Abfall des Triglycerid-Glycerins bedingt. Das Monoglycerid-Glycerin steigt zur gleichen Zeit an,

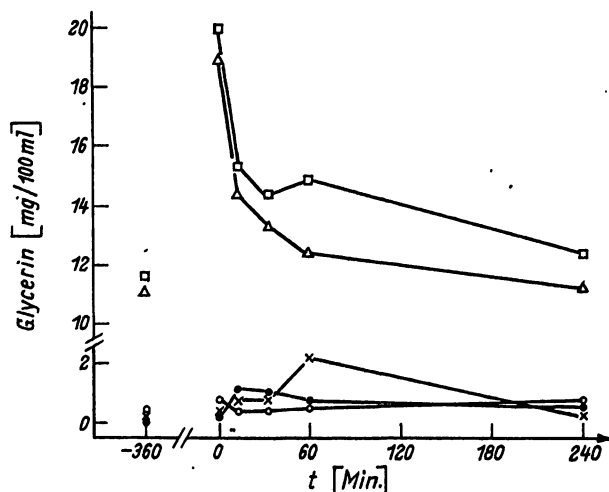
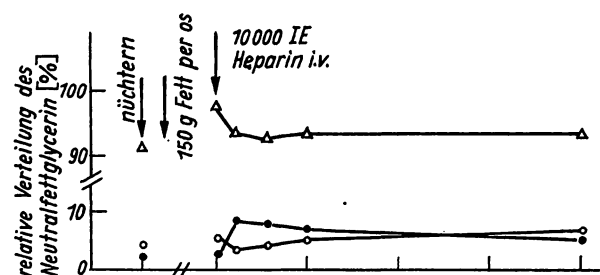


Abb. 3

Gesamtes Glycerin (□), freies Glycerin (x), Monoglycerid-Glycerin (•), Diglycerid-Glycerin (o) und Triglycerid-Glycerin (Δ) im Serum nach oraler Fettbelastung und 10000 IE Heparin i. v.

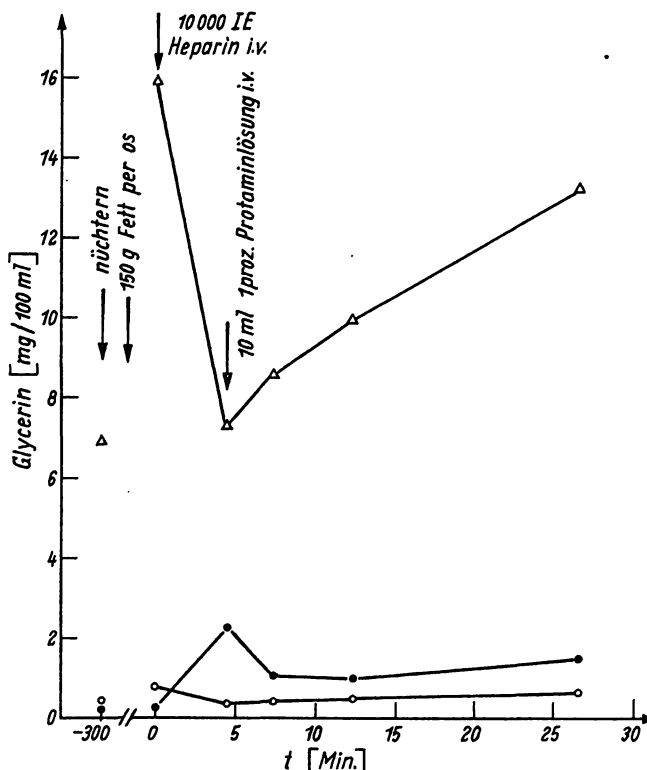


Abb. 4

Verhalten der Serumneutralfette, bestimmt als Glycerin unter oraler Fettbelastung und Gabe von Heparin und Protamin (Δ) Triglycerid-Glycerin, (o) Diglycerid-Glycerin, (•) Monoglycerid-Glycerin

das Diglycerid-Glycerin fällt gering ab. Das freie Glycerin nimmt während der ersten Stunde nach Heparin-gabe zu, weitere 3 Stunden später liegt es, wie die Neutralfettfraktionen, wieder im Normbereich. Diesen Absolutwerten entsprechen gleichgerichtete Änderungen der relativen Anteile der Glyceridfraktionen. Der Abfall des gesamten Neutralfett-Glycerins bestätigt, daß es bei der Lipämieklärung nicht nur zu einer Verschiebung zwischen den einzelnen Glyceridfraktionen, sondern zu Spaltung und Abtransport der neutralen Glyceride aus der Blutbahn kommt.

In einem weiteren Versuch wurde der Klärfaktor 5 Minuten nach Heparin-gabe durch 10 ml/ 1proz. Protaminsulfat i.v. inaktiviert (Abb. 4). Bis zu diesem Zeitpunkt bieten die Glyceridfraktionen die gleichen Veränderungen wie im ersten Versuch. Die Blutprobe 2,5 Minuten nach Protaminsulfat zeigt bereits einen Wiederanstieg des Triglycerid-Glycerins und einen Ab-

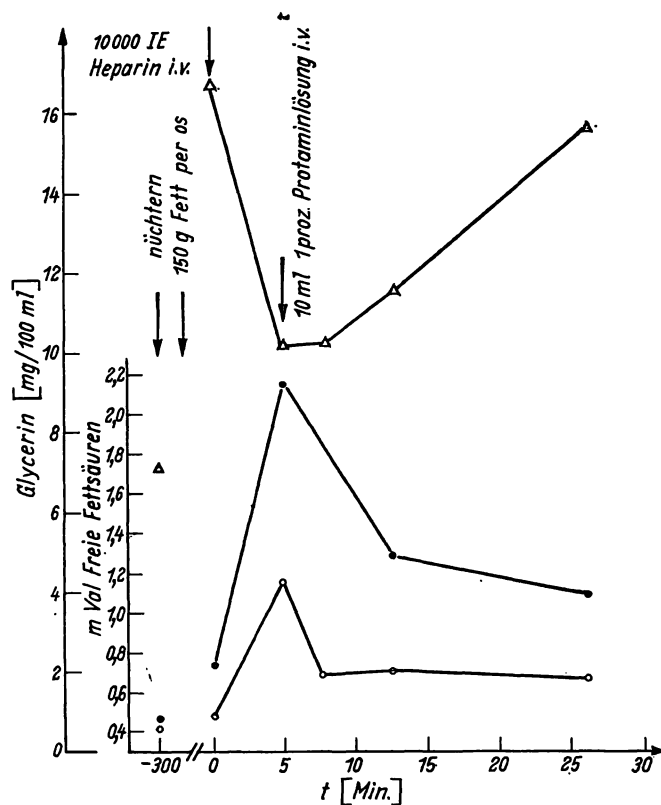


Abb. 5

Verhalten des freien (o) und Neutralfett-Glycerins (Δ) und der freien Fettsäuren (•) unter oraler Fettbelastung und Gabe von Heparin und Protamin

fall des Monoglycerid-Glycerins, während das Diglycerid-Glycerin unverändert bleibt. Im weiteren Verlauf steigt der Neutralfettgehalt fast bis zur Höhe der Lipämie vor Heparin-gabe an, Monoglycerid- und Diglycerid-Glycerin ändern sich unterdessen kaum.

Der deutliche Anstieg der Monoglyceride im Serum unter der Einwirkung des Klärfaktors könnte durch eine Ablösung der Monoglyceridmoleküle von der an die Lipoproteine gebundenen Lipase erklärt werden. Eine unterschiedliche Bildungsrate von Monoglycerid und freiem Glycerin, entsprechend der unterschiedlichen Aktivität der Triglycerid- und Monoglycerid-Lipase des Fettgewebes (17, 18), ist jedoch auch möglich. Vergleicht man die Werte des freien Glycerins (0,46 mMol/l) und der freien Fettsäuren (2,12 mVal/l) (19) 5 Minuten nach Heparin-gabe (Abb. 5), so liegt das Verhältnis bei 1:4,6, nach Abzug der Werte vor Heparin-gabe mit 1:3,8 immer noch höher als das molekulare Verhältnis von 1:3 im Triglyceridmolekül. Dies spricht für eine unvollständige Spaltung der Triglyceridmoleküle bis zu diesem Zeitpunkt, wenngleich man eine unterschiedliche Verwertung von freiem Glycerin und freien Fettsäuren in vivo in Rechnung stellen muß. Protaminsulfat führt durch Blockierung des Klärfaktors zu einem Wiederanstieg der Triglyceride, entsprechend der noch andauernden Fettresorption im Darm, während die Monoglyceride im Serum sofort absinken. Dafür bieten sich zwei Erklärungen an: Monoglyceride können als intakte Moleküle aus dem Serum abströmen und nehmen deshalb auch nach Hemmung des Klärfaktors noch ab, oder Protaminsulfat hat auf die Spaltung von Mono-

glyceriden keinen Einfluß, und der angehäuften Berg Monoglyceride wird nach Hemmung der Triglyceridspaltung schneller abgebaut.

Diskussion

Die Zuverlässigkeit einer Kombination von Dünnschichtchromatographie und enzymatischer Glycerinbestimmung steht und fällt mit der Exaktheit, mit der die beiden Methoden aneinandergefügt sind. Das Abschaben des lipidhaltigen Kieselgels von der Glasplatte, die Elution der Glyceride und die Verseifung bringen Fehlerquellen in den Arbeitsgang, die die Vorzüge beider Einzelmethode zunichte machen können. Gute Ergebnisse sind deshalb nur bei strenger Beachtung der angegebenen Arbeitstechnik zu erwarten. Die durch Bestimmung von Neutralfett-Glycerin im Lipidextrakt notwendigen Abweichungen von der Originalmethode sind in ihrer Zuverlässigkeit durch die Versuche zur Methode ausgewiesen. Die Verluste beim Abschaben der Glyceride von der Platte und bei der Elution im Zentrifugenglas mit Chloroform-Methanol fallen nicht ins Gewicht. Eine Konzentrationsänderung bei der Elution wird durch den Schliffverschleiß der Zentrifugengläser verhindert. Die Hydrolyse ist unter den gewählten Bedingungen vollständig, vorausgesetzt, daß nach dem Abdampfen des Elutionsgemisches Glyceridrückstände von der Glasinnenwand in den Spitzboden gespült und ohne Bildung von Fetttropfen in äthanolischer Kalilauge gelöst werden. Die Spezifität der Bestimmung von Neutralfett-Glycerin wird durch die dünnschichtchromatographische Trennung mit gleicher Zuverlässigkeit auf Mono-, Di- und Triglycerid-Glycerin erweitert.

Die untere Nachweisgrenze liegt bei der Bestimmung des freien oder veresterten Glycerins aus dem Serum bei 0,5 µg, was einer Extinktionsänderung von 0,017 entspricht. Nach Lipidextraktion, Dünnschichtchromatographie und Elution führen angereicherte Verunreinigungen der Lösungsmittel zu einer Erhöhung des Leerwertes, die die untere Nachweisgrenze auf 1 µg anhebt. Dieser Wert ist jedoch noch ausreichend, um auch in Fällen mit extremen Glyceridrelationen das Glycerin der Monoglycerid-Fraktion quantitativ zu erfassen.

Zieht man die Zahl der Einzelschritte, deren Abweichungen sich zum Gesamtfehler addieren, in Betracht, so ist die Reproduzierbarkeit der Methode gut. Dieses Ergebnis rechtfertigt bei Ausführung durch eine geübte Assistentin die Beschränkung auf eine Doppelbestimmung der Mono- und Diglycerid-Fraktion gegenüber der Dreifach-Bestimmung bei den Triglyceriden. Der Zeitaufwand für eine Bestimmung des Glyceridstatus (Freies Glycerin, Gesamt-Neutralfett, Mono-, Di- und Triglycerid) liegt bei 12 Stunden. Es ist von Vorteil, mehrere Analysen parallel durchzuführen und durch geschickte Zeitplanung Leerlauf zu verhüten. Unter Berücksichtigung aller Nebenarbeiten (Herstellen der Platten, Reinigung der Glaswaren, Einwiegen der Substanzen, Berechnung) sind innerhalb von 6 Tagen

zu je 8 Arbeitsstunden 4 vollständige Bestimmungen fertigzustellen.

Die Ergebnisse der Analysen bei gesunden und kranken Personen können nur als Stichproben aus einem großen noch nicht erforschten Gebiet verstanden werden, als Beispiele für die Brauchbarkeit der Methode und richtungsweisend auf anstehende Probleme.

Die ermittelten Werte für Gesamt-Neutralfett und freies Glycerin stimmen mit den Angaben in der Literatur gut überein (7, 10). Das Verhältnis der Glyceridfraktionen bei gesunden Erwachsenen wird von CARLSON und WADSTRÖM (10) mit 3 : 8 : 89 angegeben und weicht von unseren Ergebnissen nur gering ab. Bemerkenswert in ihrer Einheitlichkeit ist die Vermehrung der Triglyce-

rid-Fraktion bei den Hyperlipämien. Der in Relativ- und Absolutwerten erhöhte Triglycerid-Anstau und die relative Verminderung der beim Glyceridabbau gebildeten Zwischenstufen Di- und Monoglycerid stützen die Hypothese, daß bei einigen Hyperlipidämien eine Störung des Neutralfettabbaus vorliegt (20).

Die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit der Methode bei der Erforschung des Glyceridstoffwechsels und seiner Störungen ist durch die angeführten Beispiele hinreichend charakterisiert. Der Zeitaufwand für einen vollständigen Glyceridstatus ist jedoch noch so groß, daß erst umfassendere Untersuchungsreihen zeigen müssen, ob die diagnostische Bedeutung der Methode diesen Aufwand nicht nur in speziellen Fällen rechtfertigt.

Literatur

1. WIELAND, O., *Biochem. Z.* 329, 313 (1957). — 2. PARIJS, J., F. BARBIER und P. VERMEIRE, *diese Z.* 6, 331 (1968). — 3. SPINELLA, C. J. und M. MAGER, *J. Lipid. Res.* 7, 167 (1966). — 4. ZÖLLNER, N. und S. A. WARNOCK, *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 7, 607 (1962). — 5. KREUTZ, F. H., *Klin. Wschr.* 40, 362 (1962). — 6. EGGSTEIN, M., In: „Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut“, S. 289, Hrsg. N. ZÖLLNER und D. EBERHAGEN, Springer-Verlag Berlin (1965). — 7. EGGSTEIN, M. und F. H. KREUTZ, *Klin. Wschr.* 44, 262 (1966). — 8. SCHMIDT, F. H. und K. VON DAHL, *diese Z.* 6, 156 (1968). — 9. WOLF, H., M. KOCHSIEK-SCHUSTER und H. LÖHR, *diese Z.* 5, 205 (1967). — 10. CARLSON, L. A. und L. B. WADSTRÖM, IIIrd Int. Conf. Biochem. Probl. Lipids. In: *The blood lipids and the clearing factor*, p. 123, Palais des Académiciens Brüssel (1956). — 11. PRIVETT, O. S., M. L. BLANK und W. O. LUNDBERG, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 38, 312 (1961). — 12. ZÖLLNER, N. und G. WOLFRAM, In „Dünnschichtchromatographie“, Hrsg. E. Stahl, S. 565, Springer-Verlag, Berlin (1967). — 13. WOLFRAM, H., G. WOLFRAM und N. ZÖLLNER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 349, 19 (1968). — 14. CARLSON, L. A., *J. Atherosclerosis Res.* 3, 334 (1963). — 15. SPERRY, W. M., *Lipid Analyses*. In: D. Glick: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 2, S. 83, Interscience Publishers, Inc., New York (1955). — 16. ZÖLLNER, N., In: „Untersuchungen und Bestimmung der Lipoide im Blut“, S. 37, Hrsg. N. Zöllner und D. Eberhagen, Springer-Verlag, Berlin (1965). — 17. HAESSLER, H. A., *J. Clin. Invest.* 44, 1057 (1965). — 18. STRAND, O., M. VAUGHAN und D. STEINBERG, *J. Lipid Res.* 5, 554 (1964). — 19. TROUT, D. L., E. H. ESTES und S. J. FRIEDBERG, *J. Lipid Res.* 7, 199 (1960). — 20. FREDRICKSON, D. S., K. ONO und L. C. DAVIS, *J. Lipid Res.* 4, 24 (1963).

Prof. Dr. med. N. Zöllner
8 München 15
Pettenkoferstr. 8a